

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-213283

(43) 公開日 平成7年(1995)8月15日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/24				
1/20		A 8828-4B		
C12P 19/14		Z 7432-4B		
//(C12N 9/24				
C12R 1:41 )				

審査請求 未請求 請求項の数18 F D (全27頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-79291	(71) 出願人	000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月28日	(72) 発明者	丸田 和彦 岡山県岡山市桑野525番3-214号
(31) 優先権主張番号	特願平5-156338	(72) 発明者	久保田 倫夫 大阪府茨木市主原町12番6号
(32) 優先日	平5(1993)6月3日	(72) 発明者	杉本 利行 岡山県岡山市東畦695番44号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	三宅 俊雄 岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号
(31) 優先権主張番号	特願平5-340343		
(32) 優先日	平5(1993)12月9日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】トレハロース遊離酵素とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】還元性澱粉部分分解物からトレハロースを製造するためのトレハロース遊離酵素とその製造方法並びにその用途の確立を目的とする。

【構成】本発明は、新規トレハロース遊離酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、還元性澱粉部分分解物から、このトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素とを用いて、トレハロースおよびそれを含む糖質、並びにトレハロースを含有せしめた組成物を構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素。

【請求項 2】 グリコシル部分が、重合度 1 以上のグルコース残基から構成されている請求項 1 記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 3】 トレハロース遊離酵素が、微生物由来の酵素であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 4】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属およびマイクロコッカス属から選ばれる微生物である請求項 3 記載のトレハロース遊離酵素。

【請求項 5】 下記の理化学的性質を有するトレハロース遊離酵素。

## (1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

## (2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約 57,000 乃至 8,000 ダルトン。

## (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI 約 3.3 乃至 4.6。

## (4) 至適温度

pH 7.0、30 分間反応で、35 乃至 45℃ 付近。

## (5) 至適 pH

40℃、30 分間反応で、pH 約 6.0 乃至 7.5。

## (6) 温度安定性

pH 7.0、60 分間保持で、30 乃至 45℃ 付近まで安定。

## (7) pH 安定性

25℃、16 時間保持で、pH 約 5.0 乃至 10.0。

【請求項 6】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する作用を有し、部分アミノ酸配列として、

(1) ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-アラニン-グルタミン酸-アラニン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-グリシン-アスパラギン酸 (但し、X<sub>1</sub> はセリンまたはアラニンを意味し、X<sub>2</sub> はアラニンまたはグルタミン酸を意味する。)

(2) アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロイシン-グルタミン酸-X<sub>3</sub> (但し、X<sub>3</sub> はグルタミン酸またはアスパラギン酸を意味する。)

(3) X<sub>1</sub>-グリシン-グルタミン酸-グリシン-ア

スパラギン-トレオニン-トリプトファン-グリシン-アスパラギン酸-セリン (但し、X<sub>1</sub> はヒスチジンまたはグルタミンを意味する。)

から選ばれる 1 種または 2 種以上の部分アミノ酸配列を有するトレハロース遊離酵素。

【請求項 7】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素産生能を有する微生物を栄養培地に培養して、得られる培養物から該トレハロース遊離酵素を採取することを特徴とする末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項 8】 微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属およびマイクロコッカス属から選ばれる微生物である請求項 7 記載のトレハロース遊離酵素の製造方法。

【請求項 9】 リゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11 (工業技術院微生物工業技術研究所、受託番号 FERM BP-4130)、または、アルスロバクター・スピーシーズ (*Arthrobacter* sp.) Q36 (工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号 FERMBP-4316) からなる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素産生能を有する微生物。

【請求項 10】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質を含有する溶液に、該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素を作用させて得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項 11】 グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させることを特徴とする還元性澱粉部分分解物の還元力を増加させることなくグルコース重合度を低減させる方法。

【請求項 12】 グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる

1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性

糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項 1 3】 澱粉を部分的に加水分解して得られるグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質。

【請求項 1 4】 グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、トレハロースおよびそれ以外の夾雑糖質含有溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロース。

【請求項 1 5】 トレハロースが含水結晶、または無水結晶である請求項 1 2、請求項 1 3 または請求項 1 4 記載のトレハロース。

【請求項 1 6】 グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、次いでグルコアミラーゼを作用させ、トレハロースおよびそれ以外の夾雑糖類を含有する溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロース。

【請求項 1 7】 グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素と該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素とを作用させ、得られるトレハロース、または、これを含む糖質を含有せしめた組成物。

【請求項 1 8】 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求項 1 7 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トレハロース遊離酵素とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、この新規トレハロース遊離酵素を用いて製造されるトレハロース、および、このトレハロースを含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース) が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー (Advances in Carbohydrate Chemistry)』、第 18 巻、第 201 乃至 225 頁 (1963 年) アカデミック・プレス社 (米国) および『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology)』、第 56 巻、第 3213 乃至 3215 頁 (1990 年) などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースは、非還元性糖質ゆえにアミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、アミノ酸含有物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】 トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭 50-154485 公報で報告されている微生物を用いる方法や、特開昭 58-216695 公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合わせでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物を用いる方法は、菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当り 15w/w%

(以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w% を % と略称する。) 未満と低く、その上、これを抽出・精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼおよびトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至つ

ていない。

【0004】これに關係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開發の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素の生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であるといわ

れてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造させる澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント(Dextrose Equivalent, DE)として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、DEの大小に依存しており、澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】しかしながら、本発明者等は、当業界のこの常識を覆し、特願平4-362131号明細書で開示したように、澱粉を原料として製造されるグルコース重合度が3以上の還元性澱粉部分分解物に、これからその末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼとを作用させることにより、還元性澱粉部分分解物からトレハロースを酵素的に直接生産することに成功している。この非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼによるトレハロース製造方法では、還元性澱粉部分分解物からのトレハロース生成率は約30%であり、工業的に十分に可能であるが、反応変換率の面からトレハロース製造におけるコスト高が懸念される。そこで、還元性澱粉部分分解物からの生成率を更に向上させるトレハロースの新規製造方法の確立が望まれる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安価で安定供給可能な澱粉から生成率の高いトレハロースの新規製造方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するために、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する全く新しい酵素の実現に期待を込めて、この酵素を産生する微生物を広く検索してきた。その結果、先に、特願平4-362131号明細書で開示した土壌からの分離菌リゾビウム(Rhizobium)属に属する非還元性糖質生成酵素産生微生物M-11、および特願平5-265416号明細書で開示した土壌からの分離菌アルスロバクター(Arthrobacter)属に属する非還元性糖質生成酵素産生微生物Q36が、新規トレハロース遊離酵素をも併せて産生することを見だし、還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素とこの新規トレハロース遊離酵素とを作用させることにより、目指していた生成率の高いトレハロース生成反応を容易に行いうることを見だし、また、還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素と新規トレハロース遊離酵素とを作用させ、次いでグルコアミラーゼを作用させることにより、更に高純度トレハロース含有反応液を得ることができ、容易にトレハロースを製造しうることを見だし、本発明を完成した。更に、このトレハロース遊離酵素を産生する微生物を、公知菌より広く検索した。その結果、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属に属する微生物も本発明のトレハロース遊離酵素を産生することが判明し、前記のリゾビウム属、アルスロバクター属に属する微生物由来のトレハロース遊離酵素と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離することを見だし、本発明を完成した。併せて、このようにして得られるトレハロースまたはこれを含む糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立し本発明を完成した。

【0010】次に本発明のリゾビウム属に属する微生物M-11の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準じて行った。

【0011】

【A 細胞形態】肉汁寒天培養、27℃

通常0.6乃至0.8×1.0乃至1.5μmの桿菌。単独、希に直鎖状の二対をなし、連鎖した細胞も観察される。多形性なし。運動性あり。無孢子。鞭毛は周鞭毛。非抗酸性。グラム陰性。カプセル陰性。異染顆粒陽性。Poly-β-hydroxybutyrateを蓄積。

【0012】

【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは24時間で1.5mm。

周縁 : 全縁

50) 隆起 : 偏平状ないし半レンズ状

光沢 : あり  
 表面 : 平滑  
 色調 : 半透明、クリーム色、ピンク色色素生成なし  
 (2) デキストロース・トリプトン寒天平板培養、27℃  
 コロニーは半透明、クリーム色、mucoid生成  
 (3) 酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 形状 : 円形 大きさは5日で約3mm。  
 色調 : 半透明、クリーム色、mucoid生成 10  
 (4) コンゴレッド含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 コロニーは灰かなピンク色で、ほとんどコンゴレッドを吸収しない。  
 (5) 2w/v%NaCl含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃  
 生育する。  
 (6) 肉汁寒天斜面培養、27℃  
 生育度 : 良好  
 形状 : 糸状  
 (7) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

## (16) 炭素源の利用と酸生成の有無

D-グルコース  
 D-ガラクトース  
 D-フラクトース  
 L-アラビノース  
 D-キシロース  
 L-ラムノース  
 マルトース  
 スクロース  
 ラクトース  
 トレハロース  
 ラフィノース  
 マンニトール  
 デキストリン  
 ズルシトール

液化しない。

[0013]

[C 生理学的性質]

(1) 硝酸塩の還元性 : 陽性  
 (2) 脱窒反応 : 陰性  
 (3) メチルレッド試験 : 陰性  
 (4) VP試験 : 陰性  
 (5) インドールの生成 : 陰性  
 (6) 硫化水素の生成 : 陽性  
 (7) 澱粉の加水分解 : 陰性  
 (8) クエン酸の利用 : 陽性  
 (9) 無機窒素源の利用 : アンモニウム塩

および硝酸塩ともに利用できる。

(10) 色素の生成 : なし  
 (11) ウレアーゼ : 陽性  
 (12) オキシダーゼ : 陰性  
 (13)カタラーゼ : 陽性  
 (14) 生育の範囲 : pH 5.5

乃至9.0

20 温度 4乃至35℃

(15) 酸素に対する態度 : 好気性

利用性 酸生成

利用する 陽性  
 利用する 陽性  
 利用する 陽性  
 利用する 陽性  
 利用する 陽性  
 利用する 陽性  
 利用する 陰性  
 利用する 陽性  
 利用する 陰性  
 利用する 陰性  
 利用する 陰性  
 利用する 陽性  
 利用する 陰性  
 利用する 陰性  
 利用する 陰性

(17) アミノ酸の脱炭酸試験 : L-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、いずれに対しても陰性。

(18) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-ヒスチジン、L-プロリンいずれも利用する。

(19) DNase : 陰性

(20) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

(21) DNAのG-C含量 : 61%

[0014] 以上の菌学的性質をもとにして、『バーヂーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリアオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、

第1巻(1984年)を参考にして、公知の菌株との異同を検討した。その結果、リゾビウム属に属する微生物であることが判明した。本菌は、リゾビウム・メリロット(Rhizobium meliloti)に近い性質を示すものの、この菌とは違って、マルトース、ラクトース、マンニトールから酸を生成しない点に違いが認められ、また、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素および該非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

[0015] 本発明者等は、これらの結果に基づき、本

菌をリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11 と命名した。なお、本菌は、平成 4 年 1 2 月 2 4 日付けで、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号にある通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号、微工研条寄第 4 1 3 0 号 (FERM BP-4 1 3 0) で受託された。

【0016】本発明では、上記菌のみならず、リゾビウム属に属し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離するトレハロース遊離酵素を産生する他の菌株、更には、それらの菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0017】次に本発明のアスロバクター属に属する微生物 Q 3 6 の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、1985）に準じて行った。

#### 【0018】

##### 【A 細胞形態】

(1) 肉汁寒天培養、27℃  
通常 0.5 乃至 0.7 × 0.8 乃至 1.6 μm の桿菌。  
単独。多形性あり。運動性なし。無孢子。鞭毛なし。非抗酸性。グラム陽性。カプセル陰性。

(2) EY G 寒天培養、27℃  
桿菌-球菌の生育サイクルを示す。

#### 【0019】

##### 【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは 3 日間で 2 乃至 2.5 mm。  
周縁 : 全縁  
隆起 : 半レンズ状

光沢 : 湿光

表面 : 平滑

色調 : 半透明、白色乃至淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

(3) 酵母エキス・ペプトン寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

#### 【0020】

##### 【C 生理学的性質】

(1) 硝酸塩の還元性 : 陽性

(2) 脱窒反応 : 陰性

(3) メチルレッド試験 : 陰性

(4) VP 試験 : 陽性

(5) インドールの生成 : 陰性

(6) 硫化水素の生成 : 陽性

20 (7) 澱粉の加水分解 : 陰性

(8) セルロースの分解 : 陰性

(9) クエン酸の利用 : 陽性

(10) 無機窒素源の利用 : アンモニウム

塩および硝酸塩ともに利用できる。

(11) 色素の生成 : なし

(12) ウレアーゼ : 陽性

(13) オキシダーゼ : 陰性

(14) カタラーゼ : 陽性

(15) 生育の範囲 : pH 5 乃至

30 10 温度 4 乃至 37℃

(16) 酸素に対する態度 : 好気性

#### (17) 炭素源の利用性と酸生成の有無

	利用性	酸生成
D-グルコース	利用する	陰性
D-ガラクトース	利用する	陰性
D-フラクトース	利用する	陰性
L-アラビノース	利用する	陰性
D-キシロース	利用する	陰性
L-ラムノース	利用する	陰性
マルトース	利用する	陰性
スクロース	利用する	陰性
ラクトース	利用する	陰性
ラフィノース	利用する	陰性
マンニトール	利用する	陰性
デキストリン	利用する	陰性
ズルシトール	利用する	陰性

(18) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-ヒスチジン、L-プロリンいずれも利用する。

(19) DNase : 陽性

(20) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

50 (21) 細胞壁の主要ジアミノ酸 : リジン

(22) DNAのG-C含量 : 63%

【0021】以上の菌学的性質をもとにして、『バーゼー・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1984年)を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元糖糖質生成酵素および該非還元糖糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離する新規トレハロース遊離酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0022】本発明者等は、これらの結果に基づき、本菌を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ (Arthrobacter sp.) Q36と命名した。なお、本菌は、平成5年6月3日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号 FERM BP-4316で受託された。

【0023】本発明では上記菌株のみならず、アルスロバクター属に属し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解しトレハロースを遊離するトレハロース遊離酵素を産生する他の菌株、更には、それらの菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0024】本発明に用いられる微生物としては、本発明のトレハロース遊離酵素産生能を有するものであればよく、例えば、前記の新規微生物リゾビウム・スピーシーズM-11 FERM BP-4130およびアルスロバクター・スピーシーズQ36 FERM BP-4316だけでなく、公知微生物であるブレヴィバクテリウム・ヘロボルム (Brevibacterium helvolum) ATCC11822、ミクロコッカス・ロゼウス (Micrococcus roseus) ATCC186なども有利に利用できる。

【0025】本発明の微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、本発明のトレハロース遊離酵素を産生しうる栄養培地であればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化する物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、還元性澱粉部分分解物などの糖質、または、クエン酸、コハク酸などの有機酸またはそれらの塩なども使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、還元性澱粉部分分解物の場合には、通常、20%以

下が望ましく、菌の生育および増殖からは5%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物、および、例えば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0026】培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好氣的に行われる。培養時間は本微生物が増殖しうる時間であればよく、好ましくは10時間乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常、0.5乃至20ppmが好ましい。そのため、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、また、ファーマンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

【0027】このようにして、微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。本酵素活性は、培養物の菌体および除菌液いずれにも認められ、菌体および除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、ブレイコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸塩析法、アセトンおよびアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【0028】更に、除菌液およびその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破砕法、ガラスビーズおよびアルミナによる機械的破砕法、フレンチプレスによる破砕法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離または膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0029】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、DEAE-トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、トヨパール HW-55 樹脂を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

【0030】このようにして得られる本発明のトレハロース遊離酵素は、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

(5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。

【0031】本発明のトレハロース遊離酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトトリオシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシル  $\alpha$ -グルコシド）1.25w/v%（50mMリン酸緩衝液、pH7.0）4mlに酵素液を1ml加え40℃で30分間反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を1単位と定義する。

【0032】本酵素の基質としては、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質であればよく、例えば、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどに非還元性糖質生成酵素を作用させ得られるグルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース、マルトペンタオシルトレハロースなどのグリコシルトレハロースが用いられる。ま

た、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉質をアミラーゼまたは酸などによって部分的に加水分解し得られる還元性澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素を作用させ得られる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を含む低還元性の澱粉部分分解物が用いられる。

【0033】澱粉を部分的に加水分解するアミラーゼとしては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ (Handbook of Amylases and Related Enzymes)』（1988年）パーガモン・プレス社（東京）に記載されている、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼなどが用いられる。これらアミラーゼとブルナーゼおよびイソアミラーゼなどの枝切酵素を併用することも有利に実施できる。

【0034】基質濃度は特に限定されない。例えば、0.1%の基質溶液として用いた場合でも、50%の基質溶液として用いた場合でも、本酵素の反応は進行し、トレハロースを生成する。また、基質溶液中に完全に溶けきれない不溶性基質を含有するものであってもよい。反応温度は酵素反応が進行する温度、すなわち55℃付近までで行えばよいが、好ましくは40乃至50℃の範囲を用いる。反応pHは、通常、5乃至10の範囲に調整すればよいが、好ましくは約pH6乃至8の範囲に調整する。反応時間は、酵素反応の進行具合により適宜選択すればよく、通常、基質固形物グラム当たり約0.1乃至100単位の酵素使用量で0.1乃至100時間程度である。

【0035】原料基質からのトレハロース生成率については、比較的低DEで高分子の還元性澱粉部分分解物、すなわちグルコース重合度の高い還元性澱粉部分分解物からトレハロースを製造する場合、本発明による方法は、非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼとを用いる特願平4-362131号明細書に記載の方法と比較して、その生成率が顕著に増大する特長を有している。先願の非還元性糖質生成酵素とグルコアミラーゼの反応によって得られるトレハロース生成率が約30%であるのに対して、本発明の非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを共に作用させる反応は、トレハロース生成率が約60%またはそれ以上の高率となる。

【0036】この作用の原理は、次の通りである。すなわち、まず、比較的グルコース重合度の高い還元性澱粉部分分解物が、非還元性糖質生成酵素によりその末端にトレハロース構造を有する1分子のグルコース重合度が同じ非還元性糖質に変換され、その非還元性糖質がトレハロース遊離酵素の加水分解反応により1分子のトレハロースとグルコース重合度で2を減少した1分子の還元性澱粉部分分解物とを生成する。新たに生成した還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が3以上であれば、



この還元性澱粉部分分解物が、更に、非還元性糖質生成酵素によりその末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換されるとともにトレハロース遊離酵素により 1 分子のトレハロースとグルコース重合度で 2 を減少した 1 分子の還元性澱粉部分分解物とを生成する。このように、非還元性糖質生成酵素の反応とトレハロース遊離酵素の反応とを繰り返すことにより、1 分子の還元性澱粉部分分解物から複数分子のトレハロースとグルコース重合度が生成トレハロース分子数の 2 倍相当を減じた非還元性澱粉部分分解物とを生成させることができる。

【0037】この作用の方法は、グルコース重合度が 3 以上の還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素と本発明のトレハロース遊離酵素とを同時に作用させることも、また、該還元性澱粉部分分解物に、まず、非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いで、トレハロース遊離酵素を作用させることもできる。また、該両酵素を作用させた後、グルコアミラーゼを作用させてトレハロース生成率を更に高めることも有利に実施できる。

【0038】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H 型、OH 型イオン交換樹脂で脱塩し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

【0039】必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画、活性炭カラムクロマトグラフィーによる分画、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、アルカリ処理による還元性糖質の分解除去などの方法で精製することにより、最高純度のトレハロース製品を得ることも容易である。

【0040】このようにして得られた本発明のトレハロースを含む糖質を、必要により、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、トレハラーゼなどで加水分解したり、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼやグルコシルトランスフェラーゼなどで糖転移したりして、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶または無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0041】イオン交換カラムクロマトグラフィーとしては、特開昭 58-23799 号公報、特開昭 58-72598 号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、

夾雑糖類を除去してトレハロース高含有画分を採取する方法が有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0042】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約 60% 以上、濃度約 65 乃至 90% のトレハロース含有液を助晶缶にとり、0.1 乃至 20% の種晶共存下で、温度 95℃ 以下、望ましくは、10 乃至 90℃ の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットからトレハロース含水結晶またはこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0043】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜（母液）とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度 60 乃至 85%、晶出率 20 乃至 60% 程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60 乃至 100℃ の熱風で乾燥し、次いで 30 乃至 60℃ の温風で約 1 乃至 2 時間熟成すれば非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分 10 乃至 20%、晶出率 10 乃至 60% 程度のマスキットを数時間乃至 3 日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎または切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分 10% 未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で 50 乃至 160℃、望ましくは 80 乃至 140℃ の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0044】このようにして製造される本発明のトレハロースは、還元力がなく、安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸またはアミノ基を含有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することも、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、それ自身が良質で上品な甘味を有している。更に、トレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫歯誘発菌などによって、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料として利用できる。また、本発明の

トレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。

【0045】また、安定な甘味料であることより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他糖の晶出防止性、難醗酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0046】従って、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、嗜好物、飼料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0047】本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、果糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メイプルシュガー、エリスリトール、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種または2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0048】また、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0049】また、本発明のトレハロースおよびこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0050】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0051】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、フリ

ン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、合成酒、洋酒などの酒類、紅茶、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0052】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤として有利に利用できる。

【0053】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適応できる。例えば、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、 $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン2などのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナ

ぜ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、胎盤エキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ロイヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の健康食品や医薬品などを容易に製造できることとなる。

【0054】以上述べたような各種組成物にトレハロースを含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常、0.1%以上、望ましくは、1%以上含有せしめるのが好適である。

【0055】次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0056】まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産、精製およびその性質などを説明し、次いで、アルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素について同様に説明する。更に、公知微生物からのトレハロース遊離酵素について説明する。

【0057】

【実験1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産】パインデックス#4（松谷化学工業株式会社製造）2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%および水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズM-11（FERM BP-4130）を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0058】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて殺菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1w/vを接種し、温度27℃、pHは6.0乃至8.0に保ちつつ、約72時間通気攪拌培養した。

【0059】培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.5単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約2単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液（pH7.0）で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.6単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.8単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.9単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素

活性が約1.2単位/ml認められた。

【0060】なお、非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v%（50mMリン酸緩衝液、pH7.0）4mlに酵素液を1ml加え40℃で60分間反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に10倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1μmoleのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義した。

【0061】

【実験2 酵素の精製】実験1の方法で得られた培養液約18lを超高压菌体破碎装置ミニラボ（大日本製薬株式会社製）で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離（10,000rpm、30分間）することにより、約16lの遠心上清液を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離（10,000rpm、30分間）することにより上清を回収した。

【0062】更に、その液に硫酸を飽和度0.6になるように溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離（10,000rpm、30分間）して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離（10,000rpm、30分間）し、不溶物を除いた。その透析液（360ml）を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル（東ソー株式会社製造）を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行った。

【0063】本発明のトレハロース遊離酵素、非還元性糖質生成酵素ともDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから異なる食塩濃度においてそれぞれ溶出した。DEAE-トヨパールゲルからの溶出パターンを図1に示す。非還元性糖質生成酵素は食塩濃度約0.2Mで、トレハロース遊離酵素は食塩濃度約0.3Mで溶出し、それぞれの酵素活性画分を回収し、以下、両酵素を別々に精製した。

【0064】非還元性糖質生成酵素活性画分を2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離（10,000rpm、30分間）し不溶物を除き、得られる上清をブチルトヨパール650ゲル（東ソー株式会社製造）を用いた疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行った。吸着した本酵素を2Mから0M硫酸のリニアグラジエントでカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、トヨパールHW-55樹脂（東ソー株式会社製造）を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量300ml）を行い、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。

【0065】トレハロース遊離酵素の精製は、DEAE-トヨパールカラムから溶出したトレハロース遊離酵素活性画分を用いて、上記の非還元性糖質生成酵素の精製方法と同様に、2M硫酸を含む緩衝液に対して透析し、次いで疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【0066】精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を、非還元性糖質生成酵素の場合は表1に、本発明のトレハロース遊離酵素の場合は表2に示す。

【0067】

【表1】

工程	非還元性糖質生成酵素 の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	28,500		100
破碎後の上清	22,900	0.12	80
硫酸塩析後の透析液	21,100	0.43	74
イオン交換カラム溶出液	15,200	6.2	53
疎水カラム溶出液	7,950	101	28
ゲル濾過溶出液	5,980	197	21

【表2】

【0068】

工程	トレハロース遊離酵素 の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	37,400		100
破碎後の上清	31,500	0.17	84
硫酸塩析後の透析液	29,200	0.60	78
イオン交換カラム溶出液	25,400	5.3	68
疎水カラム溶出液	18,700	98.5	50
ゲル濾過溶出液	11,600	240	31

【0069】表1および表2の工程でそれぞれゲル濾過溶出液として得られた、精製非還元性糖質生成酵素標品および精製トレハロース遊離酵素標品をポリアクリルアミドゲル（ゲル濃度7.5%）を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0070】

【実験3 トレハロース遊離酵素の性質】実験2の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル（ゲル濃度10%）を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約58,000乃至68,000ダルトンであった。

【0071】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル（2%アンフォライン含有、スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製）を用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.3乃至4.3であった。

【0072】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図2（温度の影響）、図3（pHの影響）に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、30分間反応で、45℃付近、至適p

Hは、40℃、30分間反応で、約6.0乃至7.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図4（温度安定性）、図5（pH安定性）に示した。本酵素の熱安定性は約40℃付近までであり、pH安定性は約5乃至10であった。

【0073】【実験4 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製】基質として用いる末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質は、特願平4-362131号明細書に記載する方法に従って調製した。即ち、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースおよびマルトヘプタオースから選ばれる還元性澱粉部分分解物の20%水溶液に実験2の方法で得られた精製非還元性糖質生成酵素標品を基質固形物グラム当りそれぞれ2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、常法に従って、加熱失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮し、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（XT-1016、Na<sup>+</sup>型、架橋度4%、東京有機化

学工業株式会社製造)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質の高純度標品を調製した。得られた高純度標品のうち、グルコシルトレハロース標品中のグルコシルトレハロースの純度は97.6%で、マルトシルトレハロース標品中のマルトシルトレハロースの純度は98.6%で、マルトリオシルトレハロース標品中のマルトリオシルトレハロースの純度は99.6%で、マルトテトラオシルトレハロース標品中のマルトテトラオシルトレハロースの純度は98.3%で、マルトペンタオシルトレハロース標品中のマルトペンタオシルトレハロースの純度は

10

98.1%であった。

【0074】上記5種の非還元性糖質(グリコシルトレハロース)の20%水溶液を調製し、それぞれに実験2で得られた精製トレハロース遊離酵素を基質固形物グラム当り2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、ワコービーズ WB-T-330カラム(和光純薬工業株式会社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。対照として、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースに精製トレハロース遊離酵素を同様に作用させ、高速液体クロマトグラフィーで分析した。それらの結果を表3に示す。

【0075】

【表3】

基質	反応物	HPLC 溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコシル トレハロース	トレハロース	27.4	17.5
	グルコース	33.8	6.5
	グルコシル トレハロース	23.3	76.0
マルトシル トレハロース	トレハロース	27.4	44.3
	マルトース	28.7	44.4
	マルトシル トレハロース	21.6	11.3
マルトリオシル トレハロース	トレハロース	27.4	39.5
	マルトリオース	25.9	60.0
	マルトリオシル トレハロース	19.7	0.5
マルトテトラオシル トレハロース	トレハロース	27.4	34.2
	マルトテトラオース	24.1	65.5
	マルトテトラオシル トレハロース	18.7	0.3
マルトペンタオシル トレハロース	トレハロース	27.4	29.1
	マルトペンタオース	22.6	70.6
	マルトペンタオシル トレハロース	17.8	0.3
マルトリオース	マルトリオース	25.9	100
マルトテトラオース	マルトテトラオース	24.1	100
マルトペンタオース	マルトペンタオース	22.6	100
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	21.8	100
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	21.0	100

【0076】表3の結果から明らかなように、

1. トレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度が1以上の還元性糖質とを生成する。
2. マルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけない。

【0077】これらの結果から、本発明のトレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とその他のグリコシル部分との間の結合を極めて特異的に加水分解し、トレハロースを遊離する全く新しい作用機構の酵素であると判断される。

【0078】次いで、それぞれの反応物からトレハロースを精製するため、脱色、脱塩、濃縮し、アルカリ金属

50

型強酸性カチオン交換樹脂 (XT-1016) を用いたカラム分画を行い、トレハロース含量 97% 以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を濃縮して濃度約 65% にし、25℃ で 2 日間放置して含水トレハロース結晶を晶出させ、分蜜し、真空乾燥して、トレハロース含量 99% 以上の高純度標品を調製した。原料基質に対するそれぞれの収率は、固形物換算で、グルコシルトレハロースから 9.5%、マルトシルトレハロースから 14.9%、マルトリオシルトレハロースから 16.0%、マルトテトラオシルトレハロースから 18.5%、マルトペンタオシルトレハロースから 17.7% であった。得られたそれぞれの高純度トレハロース標品を用いてを、市販の試薬トレハロース (和光純薬工業株式会社販売) を標準品として、融点、融解熱、比旋光度、赤外線吸収スペクトル、粉末 X 線回折パターンおよびブタ腎臓由来トレハラーゼ (シグマ社販売) での分解性について比較したところ、調製したすべての高純度トレハロース標品は、融点  $97.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、融解熱  $57.8 \pm 1.2 \text{ KJ/mole}$ 、比旋光度  $+182 \pm 1.1^\circ$  で、試薬トレハロースの実測値とよく一致し、また、赤外線吸収スペクトルおよび粉末 X 線回折パターンについても、試薬トレハロースのスペクトルまたはパターンとよく一致した。更に、ブタ腎臓由来トレハラーゼ (シグマ社販売) によって、高純度トレハロース標品は試薬トレハロースと同様にグルコースに分解された。以上の結果から明らかなように、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が 3 以上の非還元性糖質に本発明のトレハロース遊離酵素を作用させ生成した糖質はトレハロースであると確認された。

【0079】

【実験 5 還元性澱粉部分分解物からのトレハロースの調製】5% ワキシコーンスターチ懸濁液を加熱糊化させた後、pH 4.5、温度 50℃ に調整し、これにイソアミラーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) を澱粉グラム当り 4,000 単位の割合になるように加え、20 時間反応させた。その反応液をオートクレーブ (120℃、10 分間) し、次いで 60℃ に冷却し、これをトヨパール HW-50S 樹脂 (東ソー株式会社製造) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル量 750 ml) でグルコース重合度 3.5 乃至 10 の還元性澱粉部分分解物を調製した。

【0080】得られた還元性澱粉部分分解物、またはグルコース重合度 3 のマルトリオースを、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 1% 濃度に調整し、これに実験 2 の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素標品および精製トレハロース遊離酵素標品をそれぞれ基質固形物当り 4 単位の割合で加え、40℃ で 24 時間作用させた後、一部を採り、脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。

【0081】残りの反応液は、更に、50℃、pH 4.5 に調整した後、グルコアミラーゼ (生化学工業株式会社製造) を基質固形物当り 50 単位の割合で加え、24 時間作用させ、同様に脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。それらの結果を表 4 に示す。

【0082】

【表 4】

還元性部分分解物の グルコース重合度	反応物	組成比 ( % )	
		非還元性糖質生成酵素 およびトレハロース 遊離酵素反応後	グルコアミラーゼ反応後
34. 1	トレハロース	80. 8	83. 5
	グルコース	0. 2	16. 5
	還元性オリゴ糖	14. 4	0. 0
	グリコシル トレハロース	4. 6	0. 0
	トレハロース		
26. 2	トレハロース	79. 7	82. 5
	グルコース	0. 2	17. 5
	還元性オリゴ糖	15. 3	0. 0
	グリコシル トレハロース	4. 8	0. 0
	トレハロース		
18. 1	トレハロース	77. 7	80. 7
	グルコース	0. 2	19. 3
	還元性オリゴ糖	17. 0	0. 0
	グリコシル トレハロース	5. 1	0. 0
	トレハロース		
15. 2	トレハロース	75. 0	78. 5
	グルコース	0. 3	21. 5
	還元性オリゴ糖	18. 6	0. 0
	グリコシル トレハロース	6. 1	0. 0
	トレハロース		
10. 0	トレハロース	66. 1	70. 1
	グルコース	0. 3	29. 9
	還元性オリゴ糖	27. 6	0. 0
	グリコシル トレハロース	7. 7	0. 0
	トレハロース		
3 ( マルト トリオース )	トレハロース	4. 2	20. 8
	グルコース	2. 1	79. 2
	マルトトリオース	65. 0	0. 0
	グリコシル トレハロース	28. 7	0. 0
	トレハロース		

( 注 ) 表中、グリコシルトレハロースは、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を意味する。

【0083】表4に示すように、非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させた後のトレハロース生成率は、グルコース重合度3のマルトトリオースでは4. 2%と幾分低い値であったが、グルコース重合度10乃至34. 1の澱粉部分分解物では66. 1乃至80. 8%の高い値が得られた。また、原料の還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が高い程、得られるトレハロース純度が高いことも判明した。更に、該両酵素を作用させた反応液にグルコアミラーゼを作用させ、残存する末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質をトレハロースとグルコースとに分解することにより、生成するトレハロース純度が

より高まることも判明した。

【0084】

【実験6 メイラード反応】実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99. 5%)の10%とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7. 0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、グルコース、マルトースを用いて、同様に処理し、480nmにおける吸光度を測定した。結果を表5に示す。

【0085】

【表5】

糖質標品	着色度 (480nm)
トレハロース (本発明)	0.006
グルコース (対照)	1.671
マルトース (対照)	0.926

【0086】表5の結果から明らかなように、トレハロース標品は、メイラード反応による着色度は僅かであり、グルコースやマルトースの着色度の僅か0.4乃至0.6%程度であり、本発明のトレハロース標品はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが判明した。従って、本糖質は、アミノ酸と混合しても、アミノ酸を損なうことが少ない糖質である。

#### 【0087】

【実験7 生体内での利用試験】厚治等が、『臨床栄養』、第41巻、第2号、第200乃至208頁(1972年)で報告している方法に準じて、実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)30gを20w/v%水溶液とし、これをボランティア6名(健康な26才、27才、28才、29才、30才、31才の男性)にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値およびインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値ともに、投与後、約0.5乃至1時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸收、代謝利用されて、エネルギー源になることが判明した。

#### 【0088】

【実験8 急性毒性試験】マウスを使用して、実験4の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量

においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD50値は、50g/kg以上であった。

#### 【0089】

【実験9 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11(FERM BP-4130)に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36(FERM BP-4316)を用いた以外は、実験1と同様に、ファーマンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.3単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約1.8単位/mlであった。実験1と同様にして菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.5単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.5単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.8単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約1.3単位/ml認められた。

#### 【0090】

【実験10 酵素の精製】実験9の方法で得られた培養液約18lを用いて、実験2と同様の方法で精製した。精製の各工程結果は非還元性糖質生成酵素の場合は表6に、トレハロース遊離酵素の場合は表7にまとめた。

#### 【0091】

【表6】

工程	非還元性糖質生成酵素 の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	23,700		100
破碎後の上清	22,400	0.15	95
破安塩析後の透析液	20,200	0.51	85
イオン交換カラム溶出液	15,100	6.5	64
疎水カラム溶出液	8,450	115	36
ゲル濾過溶出液	6,120	217	26

【表7】

工程	トレハロース遊離酵素 の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	32,500		100
破碎後の上清	30,100	0.19	93
破安塩析後の透析液	25,400	0.72	78
イオン交換カラム溶出液	22,700	22.3	70
疎水カラム溶出液	15,200	215	47
ゲル濾過溶出液	11,600	497	36

#### 【0092】



【0093】表6および表7の工程で、それぞれゲル濾過溶出液として得られた精製非還元性糖質生成酵素および精製トレハロース遊離酵素を、実験2の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた両精製酵素は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0094】

【実験11 酵素の性質】実験10の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素を、実験3の場合と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約57,000乃至67,000ダルトンであった。また、本酵素の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、等電点は3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、および本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験3の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図6に、pHの影響を図7に、温度安定性を図8に、pH安定性を図9に示した。

【0095】図から明らかなように酵素の至適温度は45℃付近、至適pHは約6.0乃至7.5である。温度安定性は45℃付近までであり、pH安定性は約5.0乃至10.0である。

【0096】【実験12 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのト

レハロースの調製】実験10の方法で得られた精製酵素を用いて、実験4の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0097】

10 【実験13 公知微生物からのトレハロース遊離酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明のトレハロース遊離酵素産生能の確認されたブレビバクテリウム・ヘロボルムATCC11822およびマイクロコッカス・ロゼウスATCC186を、実験1の場合と同様にファーメンターで27℃で72時間培養した。それぞれの培養液約18lを用いて、実験2の場合と同様に、培養液を破碎装置で処理し、その遠心上清を回収し、続いて、硫酸塩析、透析、イオン交換カラムクロマトグラフィーし、得られた部分精製酵素標品の性質を調べた。これらの結果を、前述のリゾビウム・スピーシーズ M-11およびアルスロバクター・スピーシーズ Q36の場合とともに表8にまとめた。

#### 【0098】

#### 【表8】

微生物名	イオン交換カラム 溶出液 (単位)	至適温度	至適pH	温度安定性	pH安定性
ブレビバクテリウム・ ヘロボルム ATCC11822	6,070	40℃付近	約6.5乃至6.8	40℃付近まで	約5.5乃至9.5
マイクロコッカス・ ロゼウス ATCC186	3,010	35℃付近	約6.8	30℃付近まで	約6.5乃至7.2
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	25,400	45℃付近	約6.0乃至7.5	40℃付近まで	約5.0乃至10.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	22,700	45℃付近	約6.0乃至7.5	45℃付近まで	約5.0乃至10.0

【0099】また、これらの公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験12の方法に従って、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズM-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0100】

【実験14 トレハロース遊離酵素の部分アミノ酸配列】

#### 40 (1) N末端アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の精製酵素標品および実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約80μgをN末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー モデル473A (アブライドバイオシステムズ社製造、米国)を用い、N末端から10残基まで分析した。それぞれ得られたN末端配列を表9に示す。

#### 50 【0101】

【表 9】

由来微生物	N末端アミノ酸配列
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	アラニン-リジン-プロリン-バリン-グルタ ミン-グリシン-アラニン-グリシン-アルギ ニン-フェニルアラニン
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	トレオニン-プロリン-トレオニン-チロシン -プロリン-アルギニン-グルタミン酸-アル ギニン-アラニン-リジン

【0102】表9から明らかなように、N末端アミノ酸は、リゾビウム・スピーシーズ M-11 由来酵素の場合アラニンで、それに続くアミノ酸配列は、リジン-プロリン-バリン-グルタミン-グリシン-アラニン-グリシン-アルギニン-フェニルアラニンであることが判明した。一方、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 由来酵素の場合、そのN末端アミノ酸はトレオニンであり、それに続くアミノ酸配列は、プロリン-トレオニン-チロシン-プロリン-アルギニン-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-リジンであることが判明した。

#### 【0103】(2) 内部部分アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11 由来の精製酵素標品および実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36 由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ10mMトリス・塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して透析した後、同緩衝液で約1mg/mlの濃度になるように希釈した。これら試料液 (1ml) それぞれに10μgのリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行った。リゾビウム・スピーシーズ M-11 由来酵素の場合、カブセルパックC18カラム (直径4.6mm×長さ250mm、株式会社資生堂製造) を用い、流速0.6ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-16v

/v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-48v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。アルスロバクター・スピーシーズ Q36 由来酵素の場合、マイクロボンドバックC18カラム (直径2.1mm×長さ150mm、ウオーターズ社製造、米国) を用い、流速0.9ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-30v/v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-55v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。カラムから溶出したペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離したそれぞれ3ペプチド [リゾビウム属酵素由来ペプチド、RT41 (保持時間約41分)、RT46 (保持時間約46分)、RT54 (保持時間約54分); アルスロバクター酵素由来ペプチド、AT7 (保持時間約7分)、AT30 (保持時間約30分)、AT48 (保持時間約48分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200μlの0.1v/v%トリフルオロ酢酸-50v/v%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ10残基までアミノ酸配列を分析した。得られた部分内部配列を表10に示す。

【0104】

【表10】

由来微生物	ペプチド名	内部部分アミノ酸配列
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	RT41	ヒスチジン-グリシン-グルタミン酸-グリシン -アスパラギン-トレオニン-トリプトファン- グリシン-アスパラギン酸-セリン
	RT46	アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-ア ラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロ イシン-グルタミン酸-グルタミン酸
	RT54	ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-ア ラニン-グルタミン酸-アラニン-セリン-アラ ニン-グリシン-アスパラギン酸
アルスロバク ター・スピー シーズ Q36	AT30	グルタミン-グリシン-グルタミン酸-グリシン -アスパラギン-トレオニン-トリプトファン- グリシン-アスパラギン酸-セリン
	AT48	アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-ア ラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロ イシン-グルタミン酸-アスパラギン酸
	AT7	ロイシン-アスパラギン酸-トリプトファン-ア ラニン-グルタミン酸-アラニン-アラニン-グ ルタミン酸-グリシン-アスパラギン酸

【0105】表10から明らかなように、リゾビウム・スピーシーズ M-11 酵素のペプチド RT41 の配列と、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 酵素のペプチド AT30 とは分析した 10 残基中の 9 残基が一致し、ペプチド RT46 とペプチド AT48 も分析した 10 残基中の 9 残基が一致し、また、ペプチド RT54 とペプチド AT7 とでは 8 残基が一致した。このことから、リゾビウム属に属する微生物由来の酵素とアルスロバクター属に属する微生物由来の酵素間においては、内部部分アミノ酸配列に高い相同性を有すると判断され、これらの内部部分アミノ酸配列を、ロイシン-アスパラギン-トリプトファン-アラニン-グルタミン酸-アラニン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-グリシン-アスパラギン酸（但し、X<sub>1</sub> はセリンまたはアラニンを意味し、X<sub>2</sub> はアラニンまたはグルタミン酸を意味する。）、および、アスパラギン酸-グルタミン酸-アルギニン-アラニン-バリン-ヒスチジン-イソロイシン-ロイシン-グルタミン酸-X<sub>3</sub>（但し、X<sub>3</sub> はグルタミン酸またはアスパラギン酸を意味する。）、更に、X<sub>1</sub>-グリシン-グルタミン酸-グリシン-アスパラギン-トレオニン-トリプトファン-グリシン-アスパラギン-セリン（但し、X<sub>1</sub> はヒスチジンまたはグルタミンを意味する。）と表すことができる。

【0106】以下、本発明のトレハロース遊離酵素の製造方法とそれを利用したトレハロースおよびそれを  
糖質の製造方法を実施例 A で、トレハロースおよびそれ

を含む糖質を含有せしめた組成物を実施例 B で示す。

【0107】

【実施例 A-1】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を実験 1 の方法に準じて、ファーメンターで約 80 時間培養した。培養後、SF 膜を用いて除菌濾過し、約 18 l の培養濾液を回収し、更に、その濾液を UF 膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素 (17.2 単位/ml) とトレハロース遊離酵素 (20.8 単位/ml) とを含む濃縮酵素液約 1 l を回収した。

【0108】15% とうもろこし澱粉乳に最終濃度 0.1 重量% となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH 6.0 に調整し、これに  $\alpha$ -アミラーゼ (ノボ社製造、商品名ターマミール 60L) を澱粉グラム当り 0.2 重量% になるよう加え、95℃ で 15 分間反応させた。その反応液をオートクレーブ (2 kg/cm<sup>2</sup>) を 30 分間行った後、45℃ に冷却し、これにブルナーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) を澱粉グラム当り 1,000 単位、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り 0.2 ml の割合になるように加え、48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60% のシラップを固形物当り約 9.2% で得た。

【0109】本品は固形物当りトレハロースを70.2%、グルコシルトレハロースを2.4%、マルトシルトレハロースを3.3%、グルコースを0.7%、マルトースを10.1%、マルトトリオースを12.9%およびマルトテトラオース以上のマルトオリゴ糖を0.4%含有しており、まろやかで上品な甘味、低い還元性、低い粘度、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0110】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得られた糖液を原糖液とし、トレハロースの含量を高めるため、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(XT-1016、Na<sup>+</sup>型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製造)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付ステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、マルトースおよびマルトトリオースなどの夾雑糖類を除去し、トレハロース高含有画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、トレハロース高含有粉末を固形物当り約56%の収率で得た。本品はトレハロースを約97%含有しており、極めて低い還元性、まろやかで上品な甘味を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0111】

【実施例A-3】実施例A-2の方法で得られたトレハロース高含有画分を、常法に従って、活性炭で脱色しイオン交換樹脂により脱塩して精製した溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm<sup>2</sup>の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して固形物当り約90%の収率で得た。

【0112】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0113】

【実施例A-4】実施例A-2の方法で得られたトレハ

ロース高含有画分を、実施例A-3と同様に精製し、次いで蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約3.0%のシラップとした。次いで、助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当り1%加え、120℃で5分間攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、100℃で6時間晶出熟成させてブロックを調製した。

【0114】次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して、水分0.3%の無水結晶トレハロース粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して固形物当り約85%の収率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、または加工中間物などの含 waters の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0115】

【実施例A-5】リゾビウム・スピーシーズ M-11(FERM BP-4130)の変異株を実施例A-1の方法に準じて、ファーメンターで約70時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約100lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素(約410単位/ml)とトレハロース遊離酵素(約490単位/ml)とを含む濃縮酵素液約5lを回収した。

【0116】6%馬鈴薯澱粉乳を加熱糊化させた後、pH4.5、温度50℃に調整し、これにイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当り500単位の割合になるように加え、20時間反応させた。その反応液をpH6.5に調整し、オートクレーブ(120℃)を10分間行い、次いで95℃に冷却し、これにα-アミラーゼ(ノボ社製造、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当り0.1%重量部の割合になるよう加え、15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ(130℃)を30分間行った後、45℃に冷却し、これに前記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り0.01mlの割合になるよう加え、64時間反応させた。その反応液を95℃で10分間保った後、50℃、pH5.0に調整し、グルコアミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム)を澱粉グラム当り10単位加えて40時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩し、濃度約60%に濃縮した。本糖液中には固形物当り80.5%のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度約84%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて攪拌助晶し、次いで、プラスチック製バットに取り出し、室温で3日間放置し晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料澱粉に対

して固形物当り約 90% の収率で得た。

【0117】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0118】

【実施例 A-6】アルスロバクター・スピーシーズ Q 36 (FERM BP-4316) を実験 9 の方法に準じて、ファーマンターで約 72 時間培養した。培養液を遠心分離 (10, 000 rpm, 30 分間) して除菌した後、UF 膜で濃縮し、非還元性糖質生成酵素 (16. 3 単位/ml) とトレハロース遊離酵素 (25. 1 単位/ml) とを含む濃縮液約 1 l を回収した。

【0119】馬鈴薯澱粉 1 重量部に水 6 重量部と  $\alpha$ -アミラーゼ (ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名ネオスピターゼ) 0. 01 重量部とを加え、攪拌混合し、この懸濁液の pH を 6. 2 に調整した後、85 乃至 90℃ に保ち、澱粉の糊化・液化を行い、その液化液を 120℃ で 10 分間加熱して  $\alpha$ -アミラーゼを失活させた後、45℃ に冷却し、これにイソアミラーゼ (林原生物化学研究所製造) を澱粉グラム当り 500 単位、および上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り 0. 2 ml の割合になるように加え 48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 10 分間加熱して酵素を失活させた後、50℃、pH 5. 0 に調整し、グルコアミラーゼ (ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム) を澱粉グラム当り 10 単位加えて 40 時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩し、濃度約 60% に濃縮した。本糖液中には固形物当り 78. 3% のトレハロースを含有していた。イオン交換樹脂として、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂 (オルガノ株式会社販売、商品名 CG 6000、Na<sup>+</sup> 型) を用いた以外は、実施例 A-2 の方法に従ってイオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当り約 95% のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度 75% に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約 2% を加えて攪拌助晶し、次いで、プラスチック製バットに取り出し、室温で 3 日間放置し晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料澱粉に対して固形物当り約 70% の収率で得た。

【0120】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0121】

【実施例 A-7】ブレバクテリウム・ヘロボルム A

TCC 11822 を実験 13 の方法に準じて、ファーマンターで約 72 時間培養し、培養液を破砕装置で処理し、その処理液を遠心分離 (10, 000 rpm, 30 分間) して残渣を除いた後、UF 膜で濃縮し、非還元性糖質生成酵素 (約 8 単位/ml) とトレハロース遊離酵素 (約 12 単位/ml) とを含む濃縮液約 700 ml を回収した。

【0122】33% タピオカ澱粉乳に最終濃度 0. 1% となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH 6. 0 に調整し、これに  $\alpha$ -アミラーゼ (ノボ社製造、商品名ターマミール 60 L) を澱粉グラム当り 0. 3% になるよう加え、95℃ で 20 分間反応させた。その反応液をオートクレーブ (2 kg/cm<sup>2</sup>) を 30 分間行った後、40℃ に冷却し、これにイソアミラーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) を澱粉グラム当り 200 単位、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当り 0. 2 ml の割合になるように加え、48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60% のシラップを固形物当り約 90% で得た。

【0123】本品は固形物当りトレハロースを 60. 1%、グルコシルトレハロースを 1. 4%、マルトシルトレハロースを 1. 5%、グルコースを 1. 0%、マルトースを 6. 5%、マルトリオースを 8. 3% およびマルトテトラオース以上のマルトオリゴ糖を 21. 2% 含有しており、まろやかで上品な甘味、低い還元性、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0124】

【実施例 A-8】実施例 A-6 の方法で得たトレハロース含量約 95% のトレハロース高含有液を常法にしたがって、脱色、脱塩した。本溶液を濃度約 75% に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約 2% を加えて 50℃ とし、ゆっくり攪拌しつつ徐冷して、25℃ まで下げ、バスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし、洗浄して、純度 99% 以上の高純度トレハロース含水結晶を収率約 50% で得た。

【0125】

【実施例 B-1 甘味料】実施例 A-5 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 1 重量部に、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド (東洋精糖株式会社販売、商品名  $\alpha$ G スイート) 0. 01 重量部および L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル (商品名 アスパルチーム) 0. 01 重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の

約 2.5 倍の甘味度を有し、甘味度当りカロリーは、蔗糖の約 1/2.5 に低下している。

【0126】本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。

【0127】また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0128】

【実施例 B-2 ハードキャンディー】濃度 55% 蔗糖溶液 100 重量部に実施例 A-7 の方法で得たトレハロース含有シラップ 30 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2% 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 1 重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。

【0129】本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出も起こらない高品質のハードキャンデーである。

【0130】

【実施例 B-3 チューインガム】ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖 4 重量部および実施例 A-3 の方法で得たトレハロース含水結晶 3 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。

【0131】本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

【0132】

【実施例 B-4 加糖練乳】原乳 100 重量部に実施例 A-1 の方法で得たトレハロース含有シラップ 3 重量部および蔗糖 1 重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度 70% に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。

【0133】本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0134】

【実施例 B-5 乳酸菌飲料】脱脂粉乳 175 重量部、実施例 A-1 の方法で得たトレハロース含有シラップ 130 重量部および特開平 4-281795 号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末 50 重量部を水 1,150 重量部に溶解し、65℃で 30 分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを 30 重量部接種し、37℃で 8 時間培養して乳酸菌飲料を得た。

【0135】本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用を有する。

【0136】

【実施例 B-6 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末 33 重量部に対して、実施例 A-2 の方法で得たトレハロース高含有粉末 50 重量部、蔗糖 10 重量部、無水クエン酸 0.65 重量部、リンゴ酸 0.1 重量部、L-アスコルビン酸 0.1 重量部、クエン酸ソーダ 0.1 重量部、ブルラン 0.5 重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度 40℃とし、これに、実施例 A-1 の方法で得たトレハロース含有シラップをバインダーとしてスプレーし、30 分間造粒し、計量、包装して製品を得た。

【0137】本品は、果汁含有率約 30% の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0138】

【実施例 B-7 カスタードクリーム】コーンスターチ 100 重量部、実施例 A-7 の方法で得たトレハロース含有シラップ 100 重量部、マルトース 80 重量部、蔗糖 20 重量部および食塩 1 重量部を十分に混合し、鶏卵 280 重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳 1,000 重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。

【0139】本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0140】

【実施例 B-8 ういろうの素】米粉 90 重量部に、コーンスターチ 20 重量部、蔗糖 40 重量部、実施例 A-3 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 80 重量部およびブルラン 4 重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて 60 分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。

【0141】本品は、照り、口当りも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0142】

【実施例 B-9 あん】原料あずき 10 重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きし、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約 21 重量部を得た。この生あんに、蔗糖 14 重量部、実施例 A-1 の方法で得たトレハロース含有シラップ 5 重量部および水 4 重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約 35 重量部得た。

【0143】本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。

【0144】

【実施例 B - 1 0 パン】小麦粉 1 0 0 重量部、イースト 2 重量部、砂糖 5 重量部、実施例 A - 3 の方法で得たトレハロース含有粉末 1 重量部および無機フード 0. 1 重量部を、常法に従って、水でこね、中種を 2 6℃で 2 時間発酵させ、その後 3 0 分間熟成し、焼き上げた。

【0 1 4 5】本品は、色相、すだちとともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0 1 4 6】

【実施例 B - 1 1 ハム】豚もも肉 1, 0 0 0 重量部に食塩 1 5 重量部および硝酸カリウム 3 重量部を均一にすり込んで、冷室に 1 昼夜堆積する。これを水 5 0 0 重量部、食塩 1 0 0 重量部、硝酸カリウム 3 重量部、実施例 A - 6 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 4 0 重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で 7 日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。

【0 1 4 7】本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0 1 4 8】

【実施例 B - 1 2 粉末ペプチド】4 0 % 食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社製造、商品名ハイニュート S）1 重量部に、実施例 A - 6 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 2 重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、5 0℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。

【0 1 4 9】本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0 1 5 0】

【実施例 B - 1 3 粉末味噌】赤味噌 1 重量部に実施例 A - 4 の方法で得た結晶性無水トレハロース粉末 3 重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して 1 個当たり約 4 g の固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。

【0 1 5 1】本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。

【0 1 5 2】また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

【0 1 5 3】

【実施例 B - 1 4 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で 6 0 乃至 6 4℃で殺菌し、得られる液状卵黄 1 重量部に対して、実施例 A - 4 の方法で得た無水結晶トレハロース粉末 4 重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

【0 1 5 4】本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動

食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0 1 5 5】

【実施例 B - 1 5 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A - 2 の方法で得たトレハロース高含有粉末 2 重量部、 $\alpha$ -グリコシルルチン 1 重量部、流動パラフィン 1 重量部、トリオクタン酸グリセリン 1 0 重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これに L-乳酸 2 重量部、1, 3-ブチレングリコール 5 重量部および精製水 6 6 重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

【0 1 5 6】本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0 1 5 7】

【実施例 B - 1 6 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス 0. 5 重量部に実施例 A - 4 の方法で得た無水結晶トレハロース粉末 1. 5 重量部を混捏した後、バットに移し、2 日間放置してトレハロース含水結晶に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。

【0 1 5 8】本品を適量のビタミン B 1 およびビタミン B 2 粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。

【0 1 5 9】本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【0 1 6 0】

【実施例 B - 1 7 固体制剤】ヒト天然型インターフェロン- $\alpha$  標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン- $\alpha$  抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン- $\alpha$  を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pH を変化させて、ヒト天然型インターフェロン- $\alpha$  を実施例 A - 2 の方法で得たトレハロース高含有粉末を 5 % 含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約 2 0 倍量の無水結晶マルトース粉末（株式会社林原商事販売、商品名ファイントース）に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1 錠（約 2 0 0 mg）当りヒト天然型インターフェロン- $\alpha$  を約 1 5 0 単位含有する錠剤を得た。

【0 1 6 1】本品は、舌下錠などとして、一日当り、大人 1 乃至 1 0 錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利

に利用できる。本品は、トレハロースと共にマルトースが安定剤として作用し、室温でも放置してもその活性を長期間よく維持する。

## 【0162】

【実施例 B-18 糖衣錠】重量 150mg の素錠を芯剤とし、これに実施例 A-3 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 40 重量部、プルラン（平均分子量 20 万）2 重量部、水 30 重量部、タルク 25 重量部および酸化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量配合

第 2 リン酸カルシウム	45.0%
プルラン	2.95%
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5%
グリセリン	20.0%
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0.5%
防腐剤	0.05%
実施例 3 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末	12.0%
マルチトール	5.0%
水	13.0%

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。

【0165】本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

## 【0166】

【実施例 B-20 流動食用固体制剤】実施例 A-6 の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末 500 重量部、粉末卵黄 270 重量部、脱脂粉乳 209 重量部、塩化ナトリウム 4.4 重量部、塩化カリウム 1.8 重量部、硫酸マグネシウム 4 重量部、チアミン 0.01 重量部、アスコルビン酸ナトリウム 0.1 重量部、ビタミン E アセテート 0.6 重量部及びニコチン酸アミド 0.04 重量部からなる配合物を調製し、この配合物 25 グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

【0167】本品は、1 袋分を約 150 乃至 300ml の水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管の使用法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

## 【0168】

【実施例 B-21 輸液剤】実施例 A-8 の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約 10w/v% に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してパイロジェンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。

【0169】本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度 10w/v% で血液と等張で、グルコースの場合の 2 倍濃度でエネルギー補給できる。

## 【0170】

【実施例 B-22 輸液剤】実施例 A-8 の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ

が約 230mg になるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末 65 重量部、プルラン 1 重量部および水 34 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。

【0163】本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

## 【0164】

【実施例 B-19 練歯磨】

20 酸配合物とがそれぞれ 5w/v%、30w/v% になるように水に混合溶解し、次いで実施例 10 と同様に精製してパイロジェンフリーとし、更に、プラスチック製パックに充填し施栓して製品を得た。

## 【0171】

アミノ酸配合物の組成 (mg/100ml)

L-イソロイシン	180
L-ロイシン	410
L-リジン塩酸塩	620
L-メチオニン	240
L-フェニルアラニン	290
L-スレオニン	180
L-トリプトファン	60
L-バリン	200
L-アルギニン塩酸塩	270
L-ヒスチジン塩酸塩	130
グリシン	340

30 【0172】本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

## 【0173】

【実施例 B-23 外傷治療用膏薬】実施例 A-2 の方法で製造したトレハロース高含有粉末 200 重量部およびマルトース 300 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 50 重量部を加え混合し、更に 10w/v% プルラン水溶液 200 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。

50 【0174】本品は、ヨウ素による殺菌作用のみなら



ず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

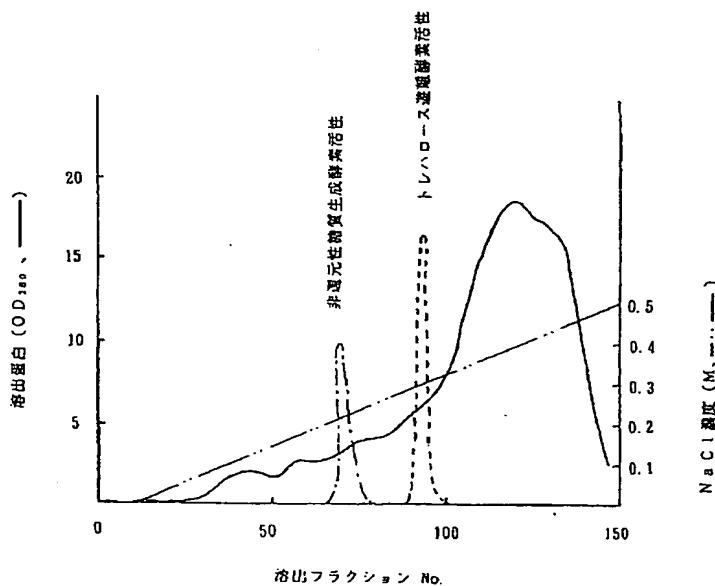
【0175】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の新規トレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離し、また、還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素とともに作用させることによって、高収率でトレハロースを生成する。そのトレハロースの分離、精製も容易であり、このようにして得られるトレハロースおよびそれを含む糖質は安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。また、輸液剤などとして非経口的に使用され、よく代謝利用される。トレハロースおよびそれを含む糖質は甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0176】従って、本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉に由来する澱粉部分分解物から、従来、望むべくして容易に得られなかったトレハロースおよびそれを含む糖質を工業的に大量かつ安価に供給できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響の大きさは、澱粉科学、酵素科学、生化学などの学問分野は言うに及ばず、産業界、とりわけ食品、化粧品、医薬品分野は勿論のこと、農水畜産業、化学工業にも及び、これら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

【図1】



【図1】DEAE-トヨパールからの本発明のトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素の溶出パターンを示す図である。

【図2】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図3】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

10 【図4】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図5】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

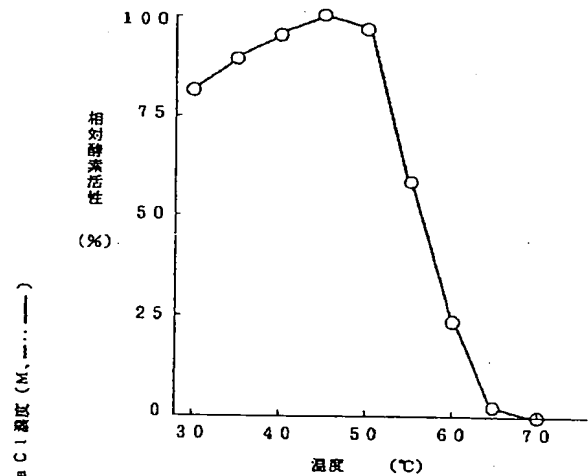
【図6】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

20 【図7】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

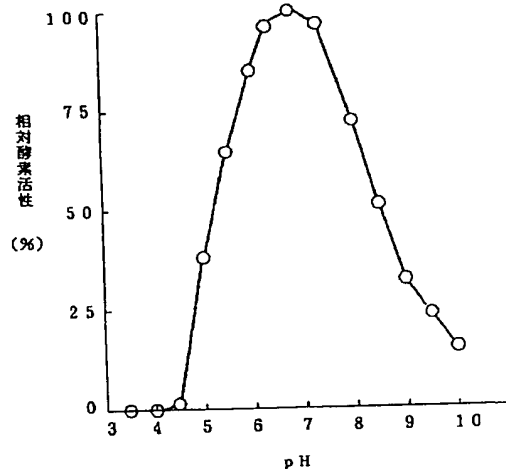
【図8】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図9】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

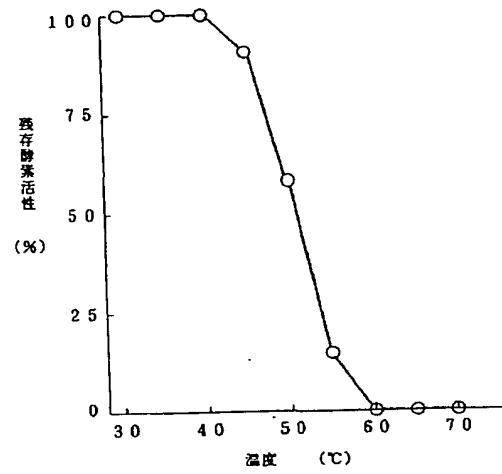
【図2】



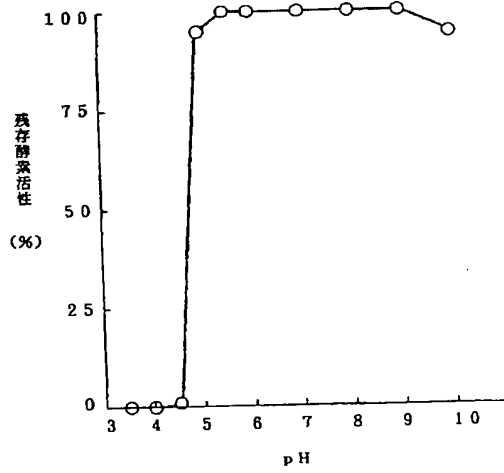
【図 3】



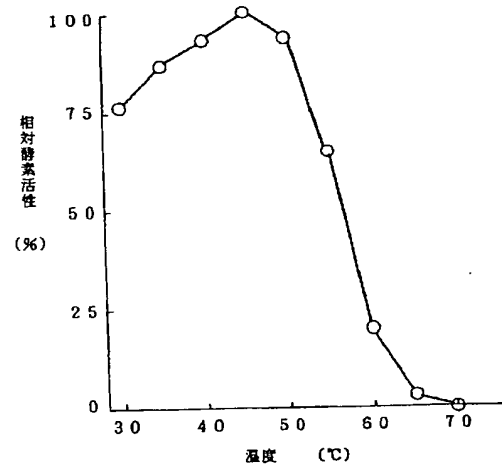
【図 4】



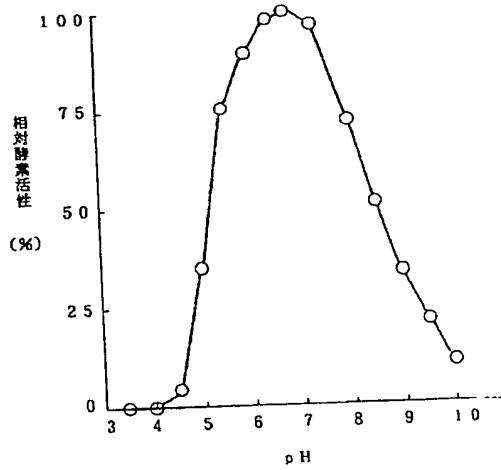
【図 5】



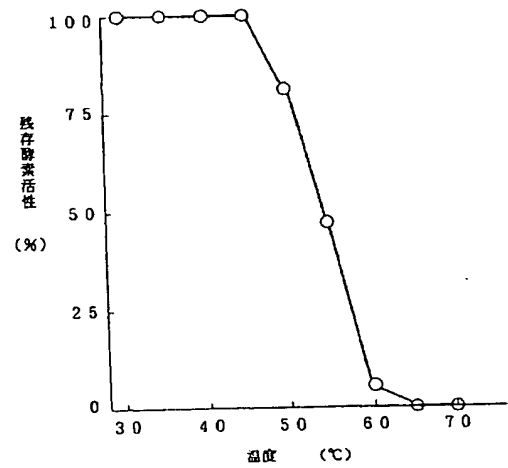
【図 6】



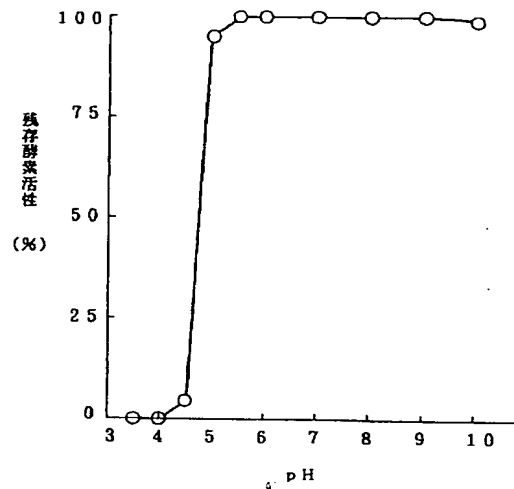
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12N 9/24

C12R 1:06 )

(C12N 9/24

C12R 1:13 )

(C12N 9/24

C12R 1:265 )

(C12N 1/20

A

C12R 1:41 )

(C12N 1/20

A

C12R 1:265 )

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**